

Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismo e a relação com a pressão arterial sistêmica¹

Carolina Z. Cavalcante^{2*}, Márcia M. Kogika³, Angela Bacic², Marcelo L. Santoro⁴, Samantha I. Miyashiro³, João P. Sault², Monica K. Oyafuso² e Denise M.N. Simões⁵

ABSTRACT.- Cavalcante C.Z., Kogika M.M., Bacic A., Santoro M.L., Miyashiro S.I., Sault J.P., Oyafuso M.K. & Simões D.M.N. 2013. [Evaluation of albuminuria and electrophoresis of urinary proteins from dogs with hyperadrenocorticism and relation with systemic arterial pressure.] Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismo e a relação com a pressão arterial sistêmica. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(11):1357-1363. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Butantã, São Paulo, SP 05508270, Brazil. E-mail: carolina.cavalcante@pucpr.br

Hyperadrenocorticism is one of the commonest endocrinopathies in dogs, and it is characterized by the excessive exposure of glucocorticoids excreted by adrenals. Chronic hypercortisolemia may promote several complications, including systemic hypertension and glomerulonephritis. Glomerulonephritis may initiate several variable degrees of proteinuria and leading to the development of chronic kidney disease. The loss of proteins through urine, mainly predominant albumin, is a characteristic of glomerular diseases and the determination of laboratory variables, such as the urinary protein-to-creatinine ratio (UPC), urinary albumin-to-creatinine ratio (UAC; ELISA test) and electrophoresis of urinary proteins are recommended to elucidate the diagnosis. Therefore, the goal of this study is to evaluate the relationship between proteinuria and systemic arterial hypertension in dogs with hyperadrenocorticism and to determine through evaluation of albuminuria and molecular weight of urinary proteins, the segment of the nephron that could be damaged. Thirty dogs with hyperadrenocorticism were evaluated and subdivided into groups; 13 dogs with systemic arterial hypertension (group I) and 17 normotensive (group II). The UPC was determined, as well as UAC and the urine protein electrophoresis by polyacrylamide gel technique, containing dodecyl sodium sulphate (SDS-PAGE). The results were compared with data obtained from 30 clinically healthy dogs. No association between systemic arterial hypertension and albuminuria was detected in dogs with hyperadrenocorticism as well as no alterations of proteins patterns or molecular weights bands of low (<60 kDa) or high molecular weight (> 60 kDa) was found. However, dogs with hyperadrenocorticism may develop glomerular and tubular injuries that were characterized by the presence of albuminuria and proteins of low and high molecular weights, independently of systemic arterial hypertension. In conclusion, the quantitative (UPC and UAC) and qualitative (SDS-PAGE) evaluation of urinary proteins could add information to indicate the possible segments of the nephrons that caused the loss of those proteins.

INDEX TERMS: Hyperadrenocorticism, dogs, glomerulonephritis, quantification of albuminuria, electrophoresis.

¹ Recebido em 12 de março de 2013.

Aceito para publicação em 19 de novembro de 2013.

² Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Butantã, São Paulo, SP 05508-270, Brasil. *Autor para correspondência: carolina.cavalcante@pucpr.br

³ Departamento de Clínica Médica, FMVZ-USP, São Paulo, SP. E-mail: mmkogika@usp.br

⁴ Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantã, Secretaria de Saúde, Av. Vital Brasil 1500, Butantã, São Paulo, SP 05503-900.

⁵ Hospital Veterinário do Departamento de Clínica Médica, FMVZ-USP, São Paulo, SP.

RESUMO.- O hiperadrenocorticismo é uma das endocrinopatias mais comuns em cães, sendo caracterizado pela exposição excessiva de glicocorticóides secretados pelas adrenais. A hipercortisolemia crônica pode promover várias complicações, incluindo hipertensão sistêmica e glomerulonefrite. A glomerulonefrite pode desencadear variáveis graus de proteinúria e uma tendência de evolução para doença renal crônica. A perda de proteínas na urina, principalmente da albumina, é uma característica das doenças glomerulares e a determinação de variáveis laboratoriais, como a razão proteína:creatinina urinária (RPC), albuminúria (teste de ELISA) e eletroforese das proteínas urinárias, são recomendadas para a elucidação do diagnóstico. Assim, o objetivo do estudo é avaliar a relação entre proteinúria e hipertensão arterial sistêmica em cães com hiperadrenocorticismo e verificar, pela avaliação da albuminúria e do peso molecular das proteínas urinárias, o segmento do néfron que foi comprometido ou lesado. Foram avaliados 30 cães com diagnóstico de hiperadrenocorticismo, subdivididos em 13 cães com hipertensão arterial sistêmica (grupo I) e 17 cães normotensos (grupo II). Foram determinados a RPC; a albuminúria pela avaliação da albumina normalizada e razão albumina:creatinina urinária (RAC) e a eletroforese de proteínas pela técnica em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os resultados foram comparados com os dados obtidos de 30 cães clinicamente saudáveis. Foi constatado que não houve influência da hipertensão arterial sistêmica nos cães com hiperadrenocorticismo em relação à quantificação da albuminúria, determinada pelo método ELISA, e nem na qualidade e quantidade das bandas de proteínas de baixo (<60 kDa) e de alto peso molecular (>60 kDa). No entanto foi determinado que cães com hiperadrenocorticismo podem desenvolver lesões glomerulares e tubulares, caracterizadas pela presença de albuminúria e de proteínas de alto e de baixo pesos moleculares, independentemente da presença de hipertensão arterial sistêmica. Conclui-se que a avaliação quantitativa (RPC e RAC) e qualitativa (SDS-PAGE) das proteínas urinárias traz informações adicionais que indicam os possíveis segmentos comprometidos dos néfrons que causaram as perdas de proteínas na urina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Hiperadrenocorticismo, cães, glomerulonefrite, quantificação da albuminúria, eletroforese.

INTRODUÇÃO

O hiperadrenocorticismo é considerado uma das endocrinopatias mais comuns em cães, sendo caracterizado pela exposição excessiva de glicocorticóides secretados pelas adrenais (Feldman 2004). A hipercortisolemia crônica ocasiona uma variedade de sintomas e anormalidades bioquímicas, acarretando em várias complicações como glomerulonefrite, hipertensão sistêmica, urolitíase, infecção do trato urinário, diabetes mellitus, pancreatite aguda, insuficiência cardíaca congestiva e tromboembolismo pulmonar (Feldman 2004, Rhett 1997).

A glomerulonefrite, como complicação do hiperadrenocorticismo, apresenta prevalência de 2,8%, segundo estudos de Cook & Cowgill (1996). Entretanto Hurley &

Vaden (1998) avaliaram a proteinúria dos cães com hiperadrenocorticismo hipofise dependente e determinaram que 43,75% apresentaram a razão proteína urinária e creatinina urinária (RPC) >1,0, ou seja, presença de proteinúria patológica.

Boutilier et al. (2004) avaliaram a RPC em 11 cães com hiperadrenocorticismo e determinaram o valor acima de 1,0 em 36,4% dos cães. Ortega et al. (1996) avaliaram a RPC em cães com hiperadrenocorticismo em diferentes fases do tratamento e observaram valores da RPC acima de 1,0 em 12 (46%) cães sem tratamento, em cinco (31%) cães não controlados com o tratamento e em três (21%) cães bem controlados com o tratamento.

A eletroforese, um método qualitativo, tem sido empregada para identificar as proteínas na urina de acordo com o peso molecular e, assim, auxiliar na identificação da localização do segmento do néfron envolvido com a perda das referidas proteínas. A eletroforese de proteínas urinárias em gel de poliacrilamida apresenta alta especificidade e sensibilidade na determinação das proteínas, pois fornece informações sobre o peso molecular (Rego et al. 2001). Schultze & Jensen (1989) diferenciaram a proteinúria de origem glomerular, tubular e a mista de 12 cães pelo método de SDS-PAGE, e concluíram que esta técnica foi eficaz na detecção da lesão renal.

Outra possibilidade de avaliação da proteinúria seria a determinação de microalbuminúria que é definida em cães como a concentração de albumina urinária entre 1 e 30mg/dL. Concentrações maiores de albumina urinária também são anormais e são denominadas de macroalbuminúria (Lees et al. 2005).

Em humanos, a microalbuminúria está geralmente associada aos casos de nefropatia diabética, hipertensão e glomerulopatias que evoluem progressivamente e ocasionam dano na barreira de filtração glomerular, levando a perda de proteína na urina (Gary et al. 2003). Koh et al. (2000) observaram que os humanos com hiperreatividade do eixo hipotálamo hipofise adrenal apresentam aumento da excreção de albumina na urina e estes pacientes com hiperadrenocorticismo desenvolveram síndrome de resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão e obesidade.

O método para a determinação da albumina na urina de cães mais utilizado é o ELISA de captura (Pressler et al. 2002). Em um estudo da concentração de albumina e microalbumina na urina, pelo método de radioimunoensaio, de pacientes humanos com hiperadrenocorticismo foi detectado, respectivamente, as frequências de 84,6% (11 pacientes) e 61,5% (8 pacientes), sendo que as concentrações diminuíram após o tratamento em 100% dos casos (Koh et al. 2000). Boutilier et al. (2004) observaram a presença de microalbuminúria, pelo método de ELISA, em 63,6% (n=7) dos cães com hiperadrenocorticismo.

A hipertensão sistêmica também é uma complicação comum do hiperadrenocorticismo que contribui adicionalmente para a progressão da lesão renal. A prevalência da hipertensão sistêmica em cães com doença glomerular e proteinúria persistente atinge cerca de 80% (Brown 1995). Os mesmos valores são referidos por Ortega et al. (1996) nos pacientes com hipertensão sistêmica como consequên-

cia do hiperadrenocorticismo não tratado, corroborando com Boutilier et al. (2004) que relataram a presença de hipertensão em grau moderado em 72,7% (n=8) dos 11 cães avaliados com hiperadrenocorticismo

Vários estudos realizados em humanos comprovaram a existência da relação entre proteinúria e hipertensão (Brown et al. 1993, 2003, Grauer et al. 2000). Cavalcante et al. (2007) avaliaram pelo método semiquantitativo a microalbuminúria em cães com hiperadrenocorticismo e a relação com a hipertensão arterial sistêmica e concluíram que a microalbuminúria ocorreu em associação com a hipertensão. A coexistência de hipertensão e proteinúria já foram relatadas em cães com hiperadrenocorticismo (Ortega et al. 1996) e em cães com diabetes mellitus (Struble 1998).

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a relação entre proteinúria, albuminúria e hipertensão arterial sistêmica em cães com hiperadrenocorticismo, como também identificar a proteína na urina pelo estudo do peso molecular, correlacionando-a com o possível segmento do néfron comprometido que ocasionou a perda daquela proteína.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 30 cães com diagnóstico clínico de hiperadrenocorticismo, atendidos no Serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais do Departamento de Clínica Médica/ Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, machos ou fêmeas, de idades e raças variadas, divididos em 13 cães com hipertensão sistêmica (grupo I) e 17 cães com pressão arterial sistólica (PAS) normal (grupo II), e que não estavam recebendo tratamento para o hiperadrenocorticismo ou medicações que conhecidamente alterasse a PAS ou, ainda, condição mórbida que ocasionasse proteinúria pré-existente. O estudo respeitou as normas de boas práticas clínicas na utilização de animais em protocolos experimentais, e foi submetido antes do início de sua execução ao Comitê de Ética para Utilização de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 708/2005) e durante a execução, o estudo foi realizado mediante a autorização escrita dos proprietários.

Os cães com hiperadrenocorticismo foram selecionados de acordo com os dados do exame clínico (anamnese e exame físico), avaliação da bioquímica sérica (fosfatase alcalina; alanina amino transferase; colesterol; triglicerídeos; uréia; creatinina e exame de urina). Após, para a confirmação do hiperadrenocorticismo e seleção dos animais, foi realizado o teste de supressão com baixa dose de dexametasona (Peterson 2007).

Os cães dos grupos I e II foram submetidos à aferição da PAS, a determinação da razão proteína e creatinina urinária (RPC) e à avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias.

O grupo controle consistiu de 30 cães machos ou fêmeas, de raças e idades variadas, clinicamente saudáveis, domiciliados e apresentando PAS normal e que também não tinham recebido nenhum fármaco que alterasse a PAS. Para a seleção deste grupo foram realizadas as determinações séricas de uréia e creatinina e o exame de urina e, também, as determinações da RPC e as avaliações da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias.

Para a determinação da proteína urinária foi utilizada a técnica com o corante azul brilhante de Coomassie G-250 (Serva®), conforme técnica descrita por Bradford (1976). A determinação da concentração de creatinina urinária foi baseada na metodologia descrita por Lustgarten & Wenk (1972). Após foi realizado o cálculo da RPC. Conforme Lees et al. (2005) o valor da RPC acima

de 1,0 indica uma quantidade anormal de proteína na urina, sendo considerado proteinúria patológica no presente estudo.

A avaliação da pressão sanguínea foi realizada com o cão em decúbito lateral, utilizando a artéria cefálica, pelo método indireto de aferição, com o uso do aparelho Doppler (Doppler Ultrasound Parks Medical® Model 811B). Foram classificados como hipertensos os cães com pressão sistólica igual ou superior a 180 mm Hg conforme descrito por Elliot (2006).

Foi empregada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para a determinação dos pesos moleculares das proteínas urinárias e esta técnica foi realizada em um conjunto de placas verticais (Unidade de eletroforese vertical EV5-2001N Bio Agency Biotecnologia®). O gel de empilhamento foi confeccionado sob concentração de 4% e o gel de separação a 10%, com espessura, largura e altura aproximadas ao tamanho da placa (Zaragoza et al. 2003a, 2003b, 2004). A quantidade de proteína na urina aplicada no gel foi padronizada em 5µg/poço. Foram aplicadas até 20 amostras por gel e uma amostra do padrão para o peso molecular (Fermentas®).

As corridas eletroforéticas foram realizadas utilizando fonte para eletroforese PS5-0003N Bio Agency Biotecnologia® com a miliamperagem pré-fixada em 40 e 65mA para o gel de empilhamento e separação, respectivamente. A coloração do gel foi realizada com o azul brilhante de Coomassie (Brilliant Blue R Sigma®). A imagem foi avaliada em sistema de densitometria (Densitômetro modelo Epson Expression® 1680) e analisada em programa específico (Vision Works Ultra- Violet Products Ltd.®).

Para maior facilidade de interpretação, devido a possível sobreposição de picos de bandas, foram consideradas duas regiões, as regiões A e B onde se localizaram as proteínas de peso molecular maior ou igual a 60 kDa e menor que 60 kDa, respectivamente. (Osborne et al. 1995, Zaragoza et al. 2003a, 2004) (Fig.1).

A quantidade de proteína presente em cada região (A e B) foi determinada após obtenção do valor da porcentagem da densidade óptica da região analisada em relação a densidade óptica total de todo o traçado eletroforético, sendo o cálculo final baseado na quantidade total de proteína urinária (5µg) aplicada na respectiva faixa do gel. O valor obtido foi corrigido considerando a concentração total de proteína presente (mg/mL) na amostra de urina, utilizando-se a concentração de creatinina urinária (mg/mL) com

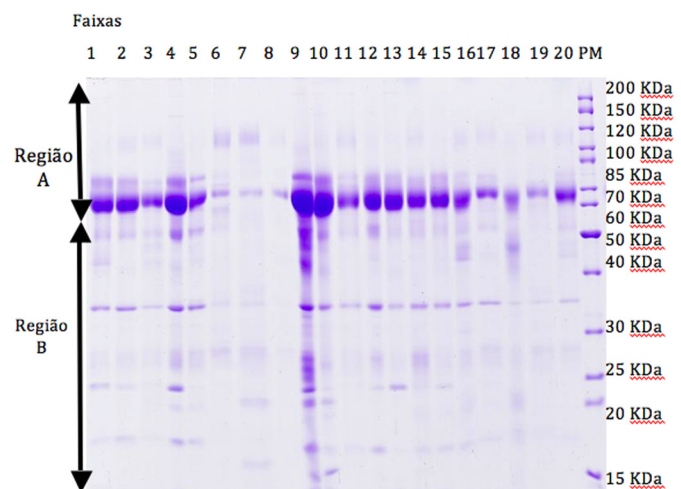


Fig.1. Gel de poliacrilamida delimitando as regiões A (com peso molecular maior ou igual a 60 kDa) e B (com peso molecular menor que 60 kDa). Os algarismos arábicos identificam as amostras de urina analisadas dos cães com hiperadrenocorticismo distribuídas nas diferentes faixas. O padrão de peso molecular está identificado como PM.

a finalidade de corrigir possíveis erros causados pela diluição ou pela concentração da amostra. Assim, foi possível obter o valor da RPC para cada região (A e B), com a finalidade de auxiliar na classificação da proteinúria de acordo com os pesos moleculares.

A concentração urinária de albumina foi determinada utilizando o método de ELISA de captura conforme técnica descrita por Rego (2006) em comprimento de onda de 492nm. A curva padrão de albumina purificada foi obtida e as amostras de urina foram diluídas de modo que as reações ocorreram dentro da faixa linear da curva padrão. Para a comparação entre os valores de albumina urinária, foram obtidos os valores da razão albumina:creatinina (RAC) e da albumina normalizada para uma densidade de 1,010 utilizando-se a fórmula a seguir apresentada, proposta por Pressler et al. (2002): Albumina normalizada = concentração mensurada de albumina urinária x (0,01/ [densidade urinária 1,0]). O valor de 1,040 foi adotado para as amostras com densidades acima de 1,040.

Conforme Pressler et al. (2002) e Rego et al. (2006) foram considerados com microalbuminúria pelos resultados da albumina normalizada, os cães que apresentaram valores de 0,01 a 0,3mg/mL; com macroalbuminúria os valores maiores que 0,3mg/mL; e negativos com valores inferiores a 0,01 mg/mL. De acordo com os resultados da RAC foram considerados negativos os cães que

apresentaram valores inferiores a 0,03, com microalbuminúria de 0,03 a 0,3 e macroalbuminúria os valores maiores que 0,3.

Os dados apresentaram distribuição não paramétrica ou não Gaussiana, sendo comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, a um nível de significância de 5%, exceto os valores da razão proteína:creatinina em logaritmo em que foi empregado o teste de análise de variância (ANOVA) de um critério (Minitab 14).

RESULTADOS

Nos cães pertencentes ao grupo I foi constatada frequência de 69,2% dos animais com o valor da razão proteína:creatinina urinária (RPC) acima de 1,0. Já nos animais pertencentes ao grupo II a frequência foi de 47,1%. Na análise estatística referente aos valores da RPC entre os grupos controle e os grupos I e II, foi observada diferença significativa ($P < 0,001$), no entanto, não foi evidenciada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos I e II.

Os traçados eletroforéticos das amostras de urina dos cães pertencentes aos grupos controle, I e II apresentaram extrema variabilidade no número de bandas de proteínas e na intensidade da densidade óptica de cada banda de proteí-

Quadro 1. Estatística descritiva da razão proteína:creatinina urinária (RPC), da RPC das regiões A e B do perfil eletroforético das proteínas urinárias, da razão albumina:creatinina urinária (RAC) e de albumina normalizada da urina de cães clinicamente normais (Controle), com hiperadrenocorticismos e hipertensos (Grupo I), e com hiperadrenocorticismos e normotensos (Grupo II)

		Controle (n=30)	Grupo I (n=13)	Grupo II (n=17)	Grupo I versus Grupo II
RPC	Média	0,139	3,684	2,216	
	Mediana	0,115	1,426	0,956	
	DP	0,135	4,375	3,140	
	EPM	0,025	1,210	0,754	
	Max	0,66	12,848	11,343	
	Min	0,006	0,010	0,010	
	Valor P		< 0,001*	< 0,001*	> 0,05
RPC Região A	Média	0,097	2,585	1,742	
	Mediana	0,066	1,281	0,7698	
	DP	0,128	3,081	2,598	
	EPM	0,023	0,854	0,630	
	Max	0,660	9,409	9,716	
	Min	0,006	0,006	0,0067	
	Valor P		< 0,001*	< 0,001*	> 0,05
RPC Região B	Média	0,041	1,099	0,474	
	Mediana	0,0196	0,254	0,1708	
	DP	0,049	1,849	0,6262	
	EPM	0,009	0,513	0,152	
	Max	0,190	6,332	1,647	
	Min	0	0,003	0	
	Valor P		< 0,001*	< 0,001*	> 0,05
RAC	Média	0,016	0,918	1,027	
	Mediana	0,002	0,567	0,3362	
	DP	0,050	1,131	2,136	
	EPM	0,001	0,314	0,518	
	Max	0,027	4,350	7,616	
	Min	0,0005	0,052	0,018	
	Valor P		< 0,001*	< 0,001*	> 0,05
Albumina normalizada	Média	0,003	0,127	0,106	
	Mediana	0,0008	0,114	0,034	
	DP	0,007	0,126	0,203	
	EPM	0,0003	0,035	0,049	
	Max	0,010	0,481	0,729	
	Min	0,0002	0,0072	0,002	
	Valor P		< 0,001*	< 0,001*	> 0,05

DP = desvio padrão; EPM = erro padrão da média; Max = máximo; Min = mínimo. * Valor de P referente a comparação entre Controle versus Grupo I ou Controle versus Grupo II.

na identificada em cada amostra de urina. Verificou-se a presença de várias bandas de proteínas distribuídas nas regiões A e B nas amostras de urina dos cães do grupo I (região A = média de 3 bandas e região B = média 6 bandas) e II (região A = média de 2 bandas e região B = média 4 bandas) e foi observado que os valores da RPC, tanto na região A quanto na região B, foram superiores ao do grupo controle. Foi constatada variabilidade no número de bandas de proteínas nas curvas eletroforéticas das amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo I e II quando comparado ao grupo controle (região A média = 3 bandas e região B média = 2 bandas). Na análise estatística comparando os valores da RPC da região A do grupo controle com a região A do grupo I e II e na comparação das regiões B dos respectivos grupos, foram observadas diferenças significantes ($P < 0,001$). Entretanto, na mesma comparação em relação aos grupos I e II não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) (Quadro 1).

Os dados obtidos nos cães do grupo controle foram considerados negativos tanto para a avaliação da albumina normalizada como para a razão albumina:creatinina urinária (RAC). A avaliação da albuminúria dos cães pertencentes ao grupo I e II esta disposta, respectivamente, nas Figuras 2 e 3, que representa os valores das medianas, dos percentis de 25 e 75% e os valores máximos e mínimos dos parâmetros albumina normalizada e RAC.

No grupo I foram constatados, considerando os valores da albumina normalizada, 84,6% dos cães com microalbuminúria, 7,7% com macroalbuminúria e 7,7% de cães negativos ou com albuminúria insignificante. Ao classificar a albuminúria com base nos valores da razão albumina: creatinina urinária (RAC), 30,8% apresentaram microalbuminúria e 69,2% macroalbuminúria. Nos cães pertencentes ao Grupo II segundo os valores de albumina normalizada, 47% dos cães apresentaram microalbuminúria, 11,8% macroalbuminúria e 41,2% dos cães eram negativos ou com albuminúria insignificante. Quanto aos valores da razão

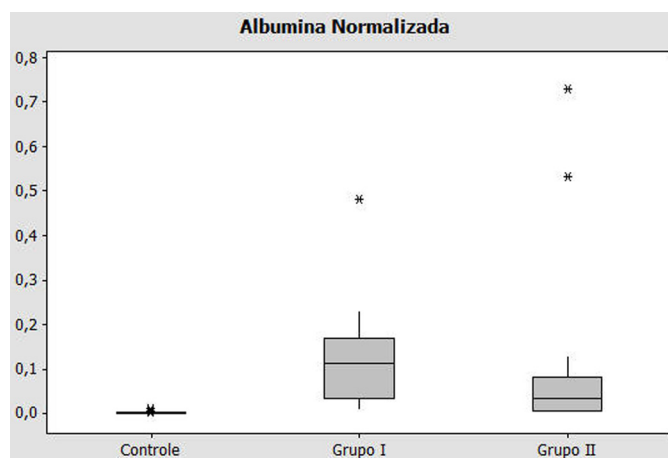


Fig.2. Representação dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), dos percentis de 25% e de 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração de albumina normalizada da urina de cães clinicamente normais (Controle), de cães com hiperadrenocorticismo hipertensos (Grupo I) e de cães com hiperadrenocorticismo normotensos (Grupo II).

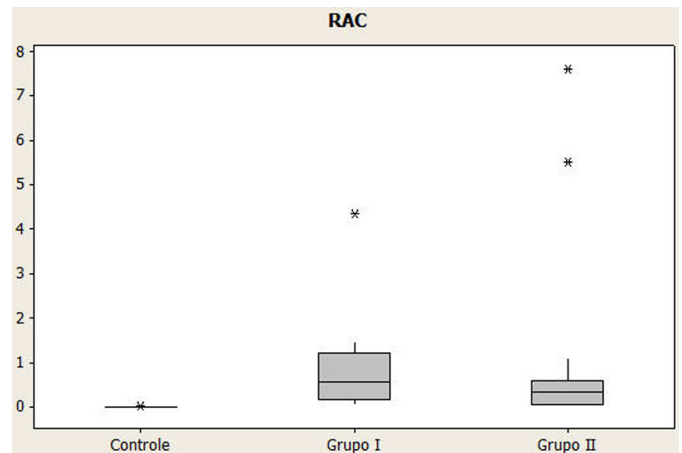


Fig.3. Representação dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), dos percentis de 25% e de 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da razão albumina:creatinina urinária (RAC) de cães clinicamente normais (Controle), de cães com hiperadrenocorticismo hipertensos (Grupo I) e de cães com hiperadrenocorticismo normotensos (Grupo II).

albumina:creatinina (RAC) urinária, 52,9% apresentaram microalbuminúria e 41,2% macroalbuminúria e 5,9% foram classificados com negativos. Na análise estatística da variável albumina normalizada entre os cães do grupo controle e os cães com hiperadrenocorticismo, incluindo os grupos I e II, foi observada diferença significativa entre estes grupos ($P < 0,001$). No entanto, não foi constatada diferença significativa entre os dois grupos doentes, grupos I e II, ($P > 0,05$). Achados semelhantes foram também observados quanto a análise dos dados referentes à variável razão albumina:creatinina urinária (RAC) (Quadro 1).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A comparação dos valores da RPC do grupo controle com os grupos I e II demonstrou existir nítida diferença ($P < 0,001$) entre os grupos de cães com hiperadrenocorticismo e os cães clinicamente normais. Os cães pertencentes ao grupo I apresentaram proteinúria patológica ($RPC > 1,0$) em 69,2% (9 cães) e os cães do grupo II em 47,1% (8 cães). Assim, a proteinúria constatada pelos valores da RPC nos cães com hiperadrenocorticismo dos grupos I e II pode ser sugestiva de proteinúria patológica decorrente de lesão renal, pois de acordo com os estudos realizados por Ortega et al. (1996) e por Hurley & Vaden (1998), a hipercortisolemia crônica pode induzir o aumento da taxa de filtração glomerular e a hipertensão glomerular, causando glomeruloesclerose e, em consequência, perda de proteínas através do glomérulo ocasionando a proteinúria patológica.

Assim, considerando-se que a hipertensão glomerular possa apresentar papel importante no desenvolvimento da lesão glomerular, os cães com hiperadrenocorticismo e hipertensão arterial sistêmica (grupo I) do presente estudo não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) na RPC quando comparado com os cães com hiperadrenocorticismo e normotensos (grupo II). Segundo Ortega et al. (1996) e Goy-Thollot et al. (2002), o tempo de duração da hipercor-

tisolemia pode aumentar a sensibilidade vascular a vasoconstrictores endógenos, desenvolvendo-se a hipertensão arterial sistêmica e glomerular e, assim, perpetuar a proteinúria. No presente estudo, entretanto, não foi possível determinar precisamente o período de evolução da doença em ambos os grupos (I e II), mas somente o tempo em que o diagnóstico de hiperadrenocorticismo foi definido. Apesar de não ter sido considerado o tempo de evolução da doença, nota-se que a hipertensão arterial sistêmica presente nos cães do grupo I não foi fator preponderante para determinar a perda maior de proteína na urina nestes animais.

Na avaliação da eletroforese quando é constatada a perda de proteínas através do glomérulo, estas corresponderiam a proteínas de alto peso molecular em que a albumina estaria também incluída e, no presente estudo, estas encontraram-se presentes na região A do traçado eletroforético. Detectou-se que todos os cães com hiperadrenocorticismo (grupos I e II) apresentaram várias bandas de proteínas na referida região A, sugerindo que a albumina poderia estar representada. A presença de proteínas na urina dos cães com hiperadrenocorticismo pode estar relacionada com a passagem através da membrana glomerular devido ao um aumento da permeabilidade do glomérulo, sendo esta hipótese possivelmente confirmada quando da comparação dos valores da RPC da região A dos cães doentes (grupos I e II) com a RPC da região A do grupo controle, em que os cães com hiperadrenocorticismo apresentaram concentrações significativamente superiores. Segundo Waters et al. (1997) e Rhett (1997), o aumento da permeabilidade glomerular ocorre nos cães com hiperadrenocorticismo devido aos efeitos imunossupressores do cortisol além da hipertensão glomerular, glomeruloesclerose e alteração da seletividade da membrana glomerular.

No que se refere à perda de proteína urinária por comprometimento do segmento tubular, principalmente do túbulo contornado proximal, esta se caracteriza pelo achado de proteínas de baixo peso molecular (<60 kDa) (Shultze & Jensen 1989, Rego 2001). No presente estudo, a avaliação qualitativa das proteínas pertencentes à região B permitiu observar que a maioria dos cães com hiperadrenocorticismo (grupos I e II) apresentava um grande número de bandas de proteínas na referida região; no entanto, a presença de proteínas de baixo peso molecular também pôde ser observada na urina de cães pertencentes ao grupo controle. Entretanto quando considerada quantitativamente, as referidas bandas de proteínas na avaliação da RPC da região B confirmou maior concentração de proteína nos cães com hiperadrenocorticismo comparada com a mesma região dos cães do grupo controle. Estes achados sugerem que os cães com hiperadrenocorticismo (grupos I e II) apresentaram perda urinária de proteína, também em parte decorrente de comprometimento/lesão tubular. De acordo com o estudo de Zaragoza et al. (2003a), que avaliaram a proteinúria de cães com leptospirose, o aumento das concentrações de proteínas de baixo peso molecular confirma a origem da proteína decorrente de comprometimento do segmento tubular. Segundo Newman et al. (2000), pode ocorrer em consequência da lesão prévia do glomérulo e a extensão da lesão também para o segmento tubular do néfron.

Assim, no presente estudo, os animais com hiperadrenocorticismo avaliados apresentaram não somente o comprometimento do segmento glomerular, mas também do segmento tubular, pois foram constatados aumentos das concentrações das bandas de proteínas em ambas as regiões, A e B, sugerindo que os cães com hiperadrenocorticismo possam também evoluir ou desenvolver doença túbulo-intersticial, conforme justificado por Newman et al. (2000), que relataram que a cronicidade da proteinúria e/ou o excesso de proteína presente no filtrado glomerular poderiam ocasionar a fibrose intersticial.

Na avaliação da albuminúria dos cães com hiperadrenocorticismo (grupos I e II) quando comparados com os cães do grupo controle, foi constatada diferença significativa ($P < 0,001$) entre os valores de RAC e albumina normalizada; entretanto esta diferença não foi observada quando a comparação das mesmas variáveis foi realizada entre os cães com hiperadrenocorticismo dos grupos I e II ($P > 0,05$), discordando com os achados de Cavalcante et al. (2007) que avaliaram a microalbuminúria, por método semiquantitativo, em cães com hiperadrenocorticismo e observaram que a microalbuminúria ocorria em associação com a hipertensão nos cães com esta afecção. Cabe ressaltar que a metodologia empregada para a mensuração da microalbuminúria no referido estudo difere do método empregado no presente estudo (quantitativo-ELISA), pois segundo relatos de Grauer et al. (2004), o teste semiquantitativo apresenta sensibilidade de 54% e especificidade de 69% quando comparado ao método quantitativo-ELISA.

A presença concomitante de hipertensão arterial sistêmica e proteinúria nos cães com hiperadrenocorticismo já foram anteriormente relatadas (Ortega et al. 1996, Goy-Thollot et al. 2002, Boutilier et al. 2004, Cavalcante et al. 2007, Mazzi et al. 2008), no entanto, a intensidade de albuminúria relacionado com a hipertensão arterial sistêmica foi avaliada até o presente momento por testes semiquantitativos (Boutilier et al. 2004, Cavalcante et al. 2007, Mazzi et al. 2008, Lien et al. 2010). No presente estudo, a albuminúria dos cães com hiperadrenocorticismo, referentes aos grupos I (com hipertensão arterial sistêmica) e II (com pressão arterial sistólica normal), não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos, concordando com estudo realizado por Lien et al. (2010). Possivelmente pelo fato do presente estudo ter sido realizado em casos clínicos em diferentes tempos de evolução da doença, como também pela ausência de mensurações seriadas da pressão arterial sistêmica e da proteinúria, não foi possível avaliar a possibilidade da influência da hipercolesterolemia crônica no aumento da sensibilidade vascular a vasoconstrictores endógenos ocasionando a hipertensão arterial sistêmica e glomerular, como também no efeito imunossupressor do cortisol causando alterações da membrana glomerular e perpetuando, assim, a proteinúria (Rhett 1997, Waters et al. 1997, Goy-Thollot et al. 2002).

De acordo com as condições apresentadas no presente estudo pode-se concluir que não houve influência da hipertensão arterial sistêmica nos cães com hiperadrenocorticismo em relação à quantificação da albuminúria avaliada pela albumina normalizada e pela razão albumina:creatinina uri-

nária, determinada pelo método ELISA e o mesmo ocorreu em relação à qualidade e quantidade das bandas de proteínas de baixo (<60 kDa) e de alto peso molecular (>60 kDa).

Sugere-se que cães com hiperadrenocorticismo possam desenvolver, durante a evolução da doença, lesões glomerulares e tubulares, caracterizadas pela presença de albuminúria e de proteínas de alto e de baixo pesos moleculares, independentemente da presença de hipertensão arterial sistêmica e que a hipercortisolemia crônica possa ser o principal fator de indução da lesão renal.

Os métodos laboratoriais, a eletroforese de proteína urinária em gel de poliácridamida associada à avaliação quantitativa da proteína total, como a determinação quantitativa da albuminúria, são passíveis de serem empregadas para a avaliação dos segmentos dos néfrons comprometidos que causaram as perdas de proteínas na urina.

Agradecimentos.- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS

- Boutlier P., Carr A. & Waldner C. 2004. Blood pressure, proteinuria, and microalbuminuria in dogs with hyperadrenocorticism and response to therapy with an angiotensin converting enzyme inhibitor. *J. Vet. Intern. Med.* 18(3):400.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72:248-254.
- Brown S.A. 1995. Primary diseases of glomerular, p.368-385. In: Osborne C.A. & Finco D.R. (Eds), *Canine and Feline Nephrology and Urology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Brown S.A., Finco D.R., Brown C.A., Crowell W.A., Alva R., Ericsson G.E. & Cooper T. 2003. Evaluation of the effects of inhibition of angiotensin converting enzyme with enalapril in dogs with induced chronic renal insufficiency. *Am. J. Vet. Res.* 64(3):321-327.
- Brown S.A., Walton C.L., Crawford P. & Bakris G.L. 1993. Long-term effects of antihypertensive regimens on renal hemodynamics and proteinuria. *Kidney Int.* 43(3):1210-1218.
- Cavalcante C.Z., Kogika M.M., Simões D.M.N., Kanachiro M.O., Prosser C.S., Miyashiro S.I. & Duarte R. 2007. Microalbuminuria in dogs with hyperadrenocorticism and relationship to blood pressure. *J. Vet. Intern. Med.* 21 (3):647.
- Cook A.K. & Cowg L.D. 1996. Clinical and pathological features of protein-losing glomerular disease in the dog: a review of 137 cases (1985-1992). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 32(4):313-322.
- Elliot J. 2006. Hypertension concensus report an update. *Annals 24th American Canine Veterinary Internal Medicine*, Louisville, USA, p.654-655. (Resumo)
- Feldman E.C. & Nelson R.W. 2004. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. W.B. Saunders, Philadelphia, p.252-357.
- Gary A.T., Cohn L.A., Kerl M.E. & Jensen W.A. 2003. The effects of exercise on microalbuminuria in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 17(3):435.
- Goy-Thollot I., Péchereau D., Kéroack S., Dezempte J.C. & Bonnet J.M. 2002. Investigation of the role of aldosterone in hypertension associated with spontaneous pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs. *J. Small Anim. Pract.* 43(11):489-492.
- Grauer G.F., Greco D.S., Getzy D.M., Cowgill L.D., Vaden S.L., Chew D.J., Polzin D.J. & Barsanti J.A. 2000. Effects of enalapril versus placebo as a treatment for canine idiopathic glomerulonephritis. *J. Vet. Intern. Med.* 14(5):526-533.
- Grauer G.F., Moore L.E., Smith A.R. & Jensen W.A. 2004. Comparison of conventional urine protein test strip method and a quantitative Elisa for the detection of canine and feline albuminuria. *J. Vet. Intern. Med.* 18(3):425.
- Harlow E. & Lane D. 1988. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 726p.
- Hurley K.J. & Vaden S.L. 1998. Evaluation of urine protein content in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212(3):369-373.
- Koh J.M., Kim J.Y., Chung Y.E., Park J.Y., Shong Y.K., Hong S.K., Kim G.S. & Lee K.U. 2000. Increased urinary albumin excretion in Cushing's syndrome: remission after correction of hipercortisolemia. *Clin. Endocrinol.* 52(3):349-353.
- Lees G.E., Brown S.A., Elliot J., Grauer G.E. & Vaden S.L. 2005. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* 19(3):377-385.
- Lien Y.H., Hsiang T.Y. & Huang H.P. 2010. Associations among systemic blood pressure, microalbuminuria and albuminuria in dogs affected with pituitary and adrenal dependent hyperadrenocorticism. *Acta Vet. Scand.* 52(1):61.
- Lustgarten J.A. & Wenk R.E. 1972. Simple rapid kinetic method for serum creatinine measurement. *Clin. Chem.* 18(11):1419-1422.
- Mazzi A., Fracassi F., Dondi F., Gentilini F. & Bergamini P.F. 2008. Ratio of urinary protein to creatinine and albumin to creatinine in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. *Vet. Res. Commun.* 32(6):299-301.
- Newman D.J., Thakkar H. & Gallagher H. 2000. Progressive renal diseases: does the quality of the proteinuria matter or only the quantity. *Clin. Chim. Acta* 297(1-2):43-54.
- Ortega T.M., Feldman E.C., Nelson R.W., Willits N. & Cowgill L.D. 1996. Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209(10):1724-1729.
- Osborne C.A., Stevens J.B., Lulich J.P., Ulrich L.K., Birb K.A., Koehler L.A. & Swanson L.L. 1995. A clinician's analysis of urinalysis, p.136-205. In: Osborne C.A. & Finco D.R. (Eds), *Canine and Feline Nephrology and Urology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Peterson M.E. 2007. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 22(1):2-11.
- Pressler B.M., Vaden S.L., Jensen W.A. & Simpson D. 2002. Detection of canine microalbuminuria using semiquantitative tests strips designed for use with human urine. *Vet. Clin. Pathol.* 31(2):55-60.
- Rego A.B., Kogika M.M., Santoro M.L., Hagiwara M.K. & Mirandola R.M. 2001. Eletroforese das proteínas urinárias de cães normais e de cães com doença renal em gel de sódio-dodecil-sulfato poliácridamida (SDS-PAGE). *Vet. Notícias* 7(2):65-72.
- Rego A.B.A.S. 2006. Microalbuminúria em cães com insuficiência renal crônica: relação com pressão sanguínea sistêmica. Tese de Doutorado em Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 108p.
- Rhett N. 1997. Complications and concurrent disease associated with canine hyperadrenocorticism. *Vet. Clin. North Am., Small Anim. Pract.* 27(2):309-320.
- Schultze A.E. & Jensen R.K. 1989. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of canine urinary proteins for the analysis and differentiation of tubular and glomerular diseases. *Vet. Clin. Pathol.* 18(4):93-97.
- Struble A.L., Feldman E.C., Nelson R.W. & Kass P.H. 1998. Systemic hypertension and proteinuria in dogs with diabetes mellitus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213(6):822-825.
- Waters C.B., Adams L.G., Scott-Moncrieff C.J., Denicola D.B., Snyder P.W., White M.R. & Gasparini M. 1997. Effects of glucocorticoid therapy on urine protein-to-creatinine ratios and renal morphology in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 11(3):172-177.
- Zaragoza C., Barrera R., Centeno F., Tapia J.A. & Mañé M.C. 2003a. Characterization of renal damage in canine leptospirosis by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting of the urinary proteins. *J. Comp. Pathol.* 129(23):169-178.
- Zaragoza C., Barrera R., Centeno F., Tapia J.A., Gonzales M. & Mañé M.C. 2003b. SDS-PAGE and western blotting of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet. Res.* 34(2):137-151.
- Zaragoza C., Barrera R., Centeno F., Tapia J.A. & Mañé M.C. 2004. Canine pyometra: a study of the proteins by SDS-PAGE and western blot. *Theor. Riogenology* 61(7/8):1259-1272.